

10/069148

PCT/JP00/05015

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

22.08.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年 5月24日

05 OCT 2000	
WIPO	PCT

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-153172

出 願 人  
Applicant (s):

株式会社ビー・エム・エル

4

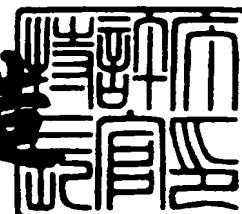
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3076048

【書類名】 特許願

【整理番号】 PBM53

【提出日】 平成12年 5月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明の名称】 物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質の  
同定方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市的場1361番地1 株式会社ビー・エム  
・エル 総合研究所内

【氏名】 平井 博之

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市的場1361番地1 株式会社ビー・エム  
・エル 総合研究所内

【氏名】 小川 一行

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市的場1361番地1 株式会社ビー・エム  
・エル 総合研究所内

【氏名】 永田 欽也

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市的場1361番地1 株式会社ビー・エム  
・エル 総合研究所内

【氏名】 高野 昇一

【特許出願人】

【識別番号】 591083336

【氏名又は名称】 株式会社ビー・エム・エル

【代理人】

【識別番号】 100103160

【弁理士】

【氏名又は名称】 志村 光春

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第236207号

【出願日】 平成11年 8月23日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 061920

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709087

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質の同定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に、同物質のヒトC R T H 2 への作用を関連付けることにより、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質を同定する、同定方法。

【請求項2】 被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する作用が、ヒトプロスタグランジンD受容体サブタイプにおいて選択的なモジュレーター作用である、請求項1記載の同定方法。

【請求項3】 被験物質における、ヒトC R T H 2 若しくはその誘導体に対する結合性を、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質の指標とする、請求項1又は2記載の同定方法。

【請求項4】 被験物質における、in situ の状態のヒトC R T H に対する作動性を、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質の指標とする、請求項1又は2記載の同定方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定の性質を有する物質の同定方法に関する発明である。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

プロスタグランジン、トロンボキサン、およびロイコトリエンのようなプロスタノイドは、アラキドン酸の酸化代謝物のひとつのファミリーであり、生体内で局所ホメオスタシスを維持するために重要な働きをしている。このプロスタノイドの一員である、プロスタグランジンD<sub>2</sub> (P G D<sub>2</sub>) は、哺乳動物では、脳、心臓、脾臓、肺、腎臓、骨髄、胃、腸、皮膚、子宮、および眼を含む多数の臓器で合成され、種々の生理活性を発揮していることが知られている (Ujihara, M. ら、Arch. Biochem. Biophys., 260: 521-531, 1988; Ito, S. ら、Prostaglandi

ns Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 37: 219-234, 1989およびその中の引用文献)。例えば、 $\text{PGD}_2$  は、中枢神経系においては睡眠導入、体温調節、嗅覚機能、ホルモン放出、炎症、および無痛覚などに関与していると考えられている (Negishi, M. ら、Prog. Lipid Res., 32: 417-434, 1993 およびその中の引用文献)。また、 $\text{PGD}_2$  は、血小板凝集を抑制する一方で、血管、胃、腸および子宮の平滑筋を弛緩させる作用を有することが知られている (Giles, H. ら、Prostaglandins, 35: 277-300, 1988 およびその中の引用文献)。さらに、 $\text{PGD}_2$  は、免疫反応で重要な役割を果たしている肥満細胞から放出される主要なプロスタノイドであり、気管支平滑筋の収縮や好酸球の炎症局所への遊走、肥満細胞や好酸球、好塩基球からの炎症性メディエーターの遊離促進などの作用を通して、アレルギー性鼻炎や気管支喘息などのアレルギー疾患の病態形成に関与していることも知られている (Negishi, M. ら、Prog. Lipid Res., 32: 417-432, 1993 およびその中の引用文献)。さらに、 $\text{PGD}_2$  には、局所投与された場合眼圧を下げる作用があることが示されている (Woodward, D.F. ら、Eur. J. Pharmacol., 230: 327-333, 1993)。

#### 【0003】

これらの知見から、 $\text{PGD}_2$  受容体に対して何らかの作用が認められる物質、例えば、 $\text{PGD}_2$  受容体の選択的なモジュレーター (アゴニストおよびアンタゴニストを含む) は、 $\text{PGD}_2$  が関与する種々の疾患の治療薬になることが期待されている。例えば、その生理作用から予想されるように、鎮静・睡眠薬、沈痛薬、血圧調節薬、血小板凝集抑制薬、循環器用薬、胃・腸の運動抑制薬、抗胃潰瘍薬、アレルギー治療薬、抗炎症薬、緑内障の予防・治療薬などとしての幅広い用途が期待される。

#### 【0004】

現在では、 $\text{PGD}_2$  は、特異的な受容体を介してその作用を発揮していることが明らかになっている (Coleman, R. ら、Pharmacol. Rev., 46: 205-229, 1994)。しかしながら、 $\text{PGD}_2$  とその受容体との反応には、種特異性があり、動物組織あるいは動物モデルを用いての薬剤のスクリーニングや薬効の評価には限界があることも分かっている (Narumiya, S. ら、Br. J. Pharmacol., 85: 367-375

, 1985)。

【0005】

また、薬理学的解析により、ヒトや動物では、 $\text{PGD}_2$  受容体には少なくとも2種のサブタイプが存在し、 $\text{PGD}_2$  の多様な薬理作用を仲介していることがしばしば示唆されている (Woodward, D.F.ら、Eur. J. Pharmacol., 230: 327-333, 1993; Fernandes, B. ら、Eur. J. Pharmacol., 283: 73-81, 1995)。例えば、ヒト子宮平滑筋では、 $\text{PGD}_2$  による収縮作用を仲介する受容体と、それとは逆に、弛緩作用を仲介する受容体の、2種の $\text{PGD}_2$  受容体サブタイプの存在が示唆されている (Fernandes, B. ら、Eur. J. Pharmacol., 283: 73-81, 1995)。従って、 $\text{PGD}_2$  の多様な作用のうち、病態の改善や予防につながる特定の作用のみをモジュレートする薬剤を開発する上においては、ヒトの各臓器における $\text{PGD}_2$  受容体サブタイプの分布状態を把握することと、この受容体サブタイプをコードするcDNAを単離することが必須であった。

【0006】

最近になり、ようやくひとつの $\text{PGD}_2$  受容体サブタイプと考えられる遺伝子がクローニングされた (以下、Dプレセプターともいう) (Boie, Y.ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995; 特表平10-507930号公報)。

【0007】

現在、このDプレセプターが、 $\text{PGD}_2$  の示す多様な生理活性のうち、具体的に、どの生理活性に関与しているのかが解析されている。その結果、例えば、ラットの脳において、Dプレセプターの発現解析を行った結果、Dプレセプターの分布と $\text{PGD}_2$  の睡眠誘導感受性領域とが一致しないとの報告がなされている (Gerashchenko, D.ら、J. Neurochem., 71: 937-945, 1998)。つまり、Dプレセプター以外の $\text{PGD}_2$  受容体の存在が示唆されており、その存在の確認と機能の同定が求められている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、Dプレセプター以外の、第2のヒト $\text{PGD}_2$  受容体サブタイプを見出し、種々の疾患の治療や予防に有用な、この第2のP

GD<sub>2</sub> 受容体サブタイプに対して作用する物質、例えば、選択的なモジュレーター（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）の同定法を提供することにある。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者は、本発明者らがヒトリンパ球より遺伝子クローニングした、G蛋白質共役受容体様蛋白質ヒトCRTH2（以下、ヒトCRTH2ともいう）〔Nagata, K.ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 および再公表特許WO 97/46677（この特許公報では、ヒトCRTH2をB19と称している）〕について、その生理的リガンドを探索する過程で、偶然にもヒトCRTH2がPGD<sub>2</sub>と選択的に反応することを見出し、さらに、ヒトCRTH2とDPレセプターを比較した結果、両者間で、PGD<sub>2</sub> 類似物質に対する反応性に違いがあることを見出した。また、ある種の化合物（例えば、ヒトCRTH2抗体）は、DPレセプターに対してなんら影響を及ぼすことなしに、ヒトCRTH2に対して選択的なアンタゴニスト活性を発揮し得ることを、本発明者は確認した。

## 【0010】

このように、当初は、PGD<sub>2</sub> とは全く無関係とも思われたヒトCRTH2が、驚くべきことに、目的とする第2のヒトPGD<sub>2</sub> 受容体サブタイプであると結論するに至った。

## 【0011】

本発明は、このヒトCRTH2のPGD<sub>2</sub> 受容体サブタイプとしての性質を用いて、ヒトPGD<sub>2</sub> に関連する有用な物質を見出し得る、物質の同定方法に関する発明である。

## 【0012】

すなわち、本発明者は、本願において、被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用（例えば、同受容体において選択的なモジュレーター作用）に、同物質のヒトCRTH2への作用を関連付けることにより、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質を同定する、被験物質の同定方法（以下、本発明同定方法ともいう）を提供する。

## 【0013】

本発明において、「モジュレーター作用」とは、対象となるプロスタグランジン受容体の働きに及ぼす何らかの作用のことを意味するものであり、代表的には、前記受容体の働きの阻害作用（典型的には、アンタゴニストが示す作用である）や、同促進作用（典型的には、アゴニストが示す作用である）等が挙げられるが、これらの作用に限定されるものではない。

## 【0014】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

## A. ヒトCRTH2について

本発明同定方法は、既知のヒト蛋白質であるヒトCRTH2が、DPレセプター以外の、第2のヒトPGD<sub>2</sub>受容体サブタイプとして機能しているという知見に基づく発明である。

## 【0015】

ヒトCRTH2は、データベースDDBJ、EMBL、GenBankにおいて、「アクセッションナンバーAB008535」として登録された、ヒト由来の蛋白質を指し、そのcDNAの塩基配列およびそれよりコードされるアミノ酸配列は公知であり、誰でも上記データベースあるいは出版物[Nagata, K.ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 および再公表特許WO97/46677（この特許公報には、「B19遺伝子」として記載されている）]より知ることができる。

## 【0016】

これらの公知の情報をもとに、純化したヒトCRTH2蛋白質又はその部分ペプチド、あるいはヒトCRTH2を発現する細胞、あるいはヒトCRTH2を含む細胞分画等を調製して、本発明同定方法において用いることができる。

## 【0017】

## (1) ヒトCRTH2又はその部分ペプチドの調製について

例えば、ヒトCRTH2の部分ペプチドや全長ペプチドは、公知の方法により化学合成して得ることができる。また、より一般的には、ヒトCRTH2の全長ペプチド、あるいは一部のアミノ酸を置換、除去又は付加した改変ペプチド、あ



るいは部分ペプチド（これらを、ヒトC R T H 2 関連蛋白質と総称することもある）の、いずれかをコードするc D N A を作製し、これを適切な発現ベクターに組み込み、さらに適切な宿主細胞をこの発現ベクターで形質転換して、この形質転換体から、組換えヒトC R T H 2 関連蛋白質を製造することができる。

#### 【0018】

ヒトC R T H 2 c D N A の、クローニングおよび組み換えは当業界周知の標準的技術を用いてなされうる。ここでいう標準的技術は、例えば、Maniatis, T.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual ( Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor, New York, 1989) に詳細に記載されている。また、公知の方法、例えば、いわゆるサイトスペシフィックミュータジェネシス (Site-Specific Mutagenesis) (Mark, D.F., ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 5662 (1984) ) 等の方法を用いて、遺伝子改変を行うことができる。

#### 【0019】

組み換えヒトC R T H 2 を、適切な宿主細胞に発現させるには、通常は、まず公知のヒトC R T H 2 c D N A の塩基配列情報を基に、発現ベクターに、ヒトC R T H 2 関連蛋白質をコードするDNA（典型的には、ヒトC R T H 2 c D N A ）をクローニングする。例えば、ヒトC R T H 2 遺伝子の発現が亢進していることが報告されている組織から抽出したpoly(A)+RNA を鋳型にして、公知の方法によりRT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)法で、ヒトC R T H 2 c D N A を単離することができる（"PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications" Innis, M.A., ら編, Academic Press, San Diego, 1990 ） 。なお、ヒトC R T H 2 遺伝子発現が高進しているヒト組織としてはTh 2 タイプTリンパ球（Nagata, K.ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 ） 、好酸球、好塩基球等を例示できる。

#### 【0020】

また、上記のごとくしてPCRで増幅したヒトC R T H 2 c D N A 断片や、化学合成したヒトC R T H 2 の塩基配列に相補的なDNAあるいはRNAをプローブとして、例えば、上記のヒトC R T H 2 高発現組織由来のc D N A ライブラリーから、ヒトC R T H 2 c D N A の全長を入手する伝統的な手法を採用してもよ

い。このような伝統的な手法は、例えばManiatis, T.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989) に詳細に記載されている。

#### 【0021】

ヒトC R T H 2 c D N A等のヒトC R T H 2 関連蛋白質をコードするDNAを組み込む発現用ベクターは、通常発現しようとする遺伝子上流域にプロモーター、エンハンサー、および下流域に転写終了配列等を保有するものを用いるのが好適である。また、ヒトC R T H 2 遺伝子の発現は、直接発現系に限らず、例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子やチオレドキシン遺伝子を利用した融合タンパク質発現系とすることもできる。

#### 【0022】

かかる遺伝子発現用ベクターとしては、例えば、宿主を大腸菌とするものとしては、pQE, pGEX, pT7-7, pMAL, pTrxFus, pET, pNT26CII等を例示することができる。また、宿主を枯草菌とするものとしては、pPL608, pNC3, pSM23, pKH80等を例示することができる。また、宿主を酵母とするものとしては、pGT5, pDB248X, pART1, pREP1, YEp13, YRp7, YCp50等を例示することができる。また、宿主を哺乳動物細胞又は昆虫細胞とするものとしては、p91023, pCDM8, pcDL-SR $\alpha$ 296, pBCMGSNeo, pSV2dhfr, pSVdhfr, pAc373, pAcYM1, pRc/CMV, pREP4, pcDNAI等を例示することができる。

#### 【0023】

これらの遺伝子発現ベクターは、ヒトC R T H 2 関連蛋白質を発現させる目的に応じて選択することができる。例えば、大量にヒトC R T H 2 関連蛋白質を発現させることを企図する場合には、宿主として大腸菌、枯草菌又は酵母等を選択し得る遺伝子発現ベクターを選択するのが好ましく、少量でも確実に活性を有するようにヒトC R T H 2 関連蛋白質を発現させることを企図する場合には、哺乳動物細胞や昆虫細胞を宿主として選択し得る遺伝子発現ベクターを選択するのが好ましい。なお、上記のように既存の遺伝子発現ベクターを選択することも可能

であるが、目的に応じて適宜遺伝子発現ベクターを作出して、これを用いることも勿論可能である。

#### 【0024】

ヒトC R T H 2 関連蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだ発現用ベクターの宿主細胞への導入及びこれによる形質転換法は、一般的な方法、例えば宿主が大腸菌や枯草菌である場合には、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を；宿主が哺乳動物細胞や昆虫細胞の場合はリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法又はリポソーム法等の手段により行うことができる。

#### 【0025】

このようにして得られる形質転換体を常法に従い培養することにより、所望するヒトC R T H 2 関連蛋白質が蓄積される。かかる培養に用いられる培地は、宿主細胞の性質に応じて適宜選択することができるが、例えば宿主が大腸菌である場合には、L B 培地やT B 培地等が、宿主が哺乳動物細胞の場合には、R P M I 1640 培地等を適宜用いることができる。

#### 【0026】

上述の手順等により得られる組換えヒトC R T H 2 関連蛋白質は、純粋なヒトC R T H 2 蛋白質として単離精製して使用することが可能である。ヒトC R T H 2 関連蛋白質の精製には公知の技術、例えば、細胞の可溶化、タンパク沈澱剤による処理、限外濾過、ゲル濾過、高速液体クロマトグラフィー、遠心分離、電気泳動、特異抗体や特異的リガンドを用いたアフィニティクロマトグラフィー、透析法等を単独で又はこれらの方法を組み合わせて用いることができる。なお、一般的なプロスタノイド受容体の精製法については、例えばUshikubi, F.ら、J. Biol. Chem., 264: 16496-16501, 1989に記載されており、この精製法に準じて精製工程を行うことができる。

#### 【0027】

(2) ヒトC R T H 2 を発現する細胞、あるいはヒトC R T H 2 を含む細胞分画等について

前述したように、組換えヒトC R T H 2 関連蛋白質を用いずに、天然のヒトC R T H 2 を高発現しているヒト組織あるいはヒト細胞株等を、本発明同定方法に

において用いることも可能である。また、上記のヒトC R T H 2 関連蛋白質をコードする遺伝子による形質転換体を用いることも可能である。ただし、この場合、これらの組織や細胞株等が、ヒトC R T H 2 を発現すると同時に、D P レセプターや他のプロスタノイドレセプターを発現していないことが望ましい。

## 【0028】

ヒトC R T H 2 発現細胞は、それ自体を、本発明同定方法において使用することができるし、それよりヒトC R T H 2 蛋白質を含む細胞分画（例えば、超音波破碎処理と超遠心法により得た膜成分等）を得ることもできる。

## 【0029】

以上、(1) (2)に記載したように、純化したヒトC R T H 2 関連蛋白質、あるいはヒトC R T H 2 を発現する細胞、あるいはヒトC R T H 2 を含む細胞分画等（以下、これらの蛋白質、細胞、細胞分画等を総称して、ヒトC H T R 2 等ともいう）を調製して、これらを本発明同定方法に用いることができる。

B. 本発明同定方法の内容について

前述したように、本発明同定方法では、被験物質のヒトC H T R 2 等への作用が、被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に関連付けられ、この関連付けが行われる前提として、被験物質のヒトC H T R 2 等への作用を特定することが必要となる。

## 【0030】

被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する作用として代表的な作用が、ヒトプロスタグランジンD受容体サブタイプにおいて選択的なモジュレーター作用である。

## 【0031】

以下、この選択的なモジュレーター作用を中心に説明する。

既に述べたように、本発明同定方法は、ヒトC R T H 2 が、D P レセプター以外の、第2のヒトP G D<sub>2</sub> 受容体サブタイプとして機能しているという知見に基づく同定方法である。よって、被験物質が、ヒトC R T H 2 の活性に選択的なモジュレーターとして同定されれば、その被験物質が、第2のヒトP G D<sub>2</sub> 受容体に対する選択的モジュレーターとして同定されることとなる。ヒトC R T H 2 の

活性に選択的なモジュレーターは、前述したように、例えば、純化したヒトC R T H 2 蛋白質又は部分ペプチド、あるいはヒトC R T H 2 を発現する細胞、あるいはヒトC R T H 2 を含む細胞分画を用い、例えば、ヒトC R T H 2 に対する選択的な結合能あるいはヒトC R T H 2 の機能に対する選択的な効果などによって同定される。

#### 【0032】

上述したように、本発明同定方法では、種々の分子形態のヒトC R T H 2 を使用することが可能であるが、ヒトC R T H 2 の選択的なモジュレーターの活性評価にあたっては、一般的にいくつかの考慮すべき点がある。まず、P G D<sub>2</sub> と実質的な相互作用をするのに必要なヒトC R T H 2 の最小ドメインは、現在のところ不明である。従って、ヒトC R T H 2 の部分ペプチドを使用するより、ヒトC R T H 2 蛋白質の全長を使用した方が、現在のところは好適であるかもしれない。また、ヒトC R T H 2 蛋白質の一部のアミノ酸を置換あるいは除去したヒトC R T H 2 蛋白質の誘導体では、リガンド選択性が変化する可能性がある。従って、天然のヒトC R T H 2 蛋白質と同一のアミノ酸配列をもったものを使用することが好適かもしれない。また、ヒト膜蛋白質として存在するヒトC R T H 2 の細胞外領域には糖鎖が結合しており、その糖鎖がP G D<sub>2</sub> と有効に相互作用するのに必要である可能性がある。従って、ヒトC R T H 2 を発現させる宿主は糖鎖を付加しうる宿主細胞が好適かもしれない。この場合さらに、糖鎖の種類がヒトC R T H 2 の機能に関係する可能性がある。従って、糖鎖構造に関する十分な情報が入手されるまでは、ほ乳類動物細胞を宿主細胞として使用することが好適かもしれない。勿論、ヒトC R T H 2 モジュレーターの大量のスクリーニングに当たっては、上述した改変ヒトC R T H 2 やヒトC R T H 2 の部分ペプチド等が有利な場合があるので、目的に応じて使用するヒトC R T H 2 の分子形態を選ぶことができる。

#### 【0033】

本発明同定方法によって、ヒトC R T H 2 等の活性に選択的なモジュレーターを同定するに際して、その被験物質は全く限定されない。すなわち、本発明同定方法の被験物質は、天然物（生物工学的手法により製造された組換え蛋白質等を

含む)、化学合成品であってもよい。また、本発明同定方法を行うに際しては、必要に応じて、公知の標識又は非標識のリガンド（例えば、ヒトPGD<sub>2</sub>等のプロスタノイド）を用いることができる。

## 【0034】

被験物質のヒトCHTR2等への作用の同定方法は、特に限定されず、当業界周知のアッセイ法を用いて測定することができる。例えば、プロスタノイドの受容体結合アッセイ法は、Boie, Y.ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995等に記載されている。

## 【0035】

被験物質のヒトCHTR2等への作用、例えば、選択的なモジュレーター作用を、被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に関連付ける場合、代表的な手段の一つとして、(1)被験物質における、ヒトCRTH2関連蛋白質に対する結合性を指標とする手段を挙げることができる。

## 【0036】

この手段を用いる場合、例えば、被験物質の精製ヒトCRTH2への結合は、表面プラズモン共鳴を測定原理とした装置[例えばBiacore 2000(アマシャムフェルマシア社)]で直接測定することができる(例えばBoris, J.ら、J. Biol. Chem., 272:11384-11391, 1997に記載された方法を例示できる)。また、被験物質のヒトCRTH2への結合は、標識した被験物質を用いて直接試験することも可能であり、また、上述したように、標識した公知のリガンド(例えば、[<sup>3</sup>H]標識PGD<sub>2</sub>)の結合の阻害もしくは増強を指標に測定することもできる(例えば、Boie, Y.ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995に記載された方法を例示できる)。

## 【0037】

この手段により、被験物質に、ヒトCRTH2関連蛋白質に対する結合性が認められれば、被験物質が、ヒトプロスタグランジンD<sub>2</sub>受容体に対して、阻害作用や増強作用等の何らかの作用を及ぼすモジュレーターである可能性が高くなる。

## 【0038】

また、上記の代表的な手段の他の態様として、(2) 被験物質における、ヒトプロスタグランジンD受容体に対する作動性を指標とする手段を挙げることができる。

## 【0039】

すなわち、被験物質による、*in situ* の状態のヒトC R T H 2の活性化、あるいはPGD<sub>2</sub>によるヒトC R T H 2の活性化に与える作用（阻害あるいは増強）で、被験物質における、ヒトプロスタグランジンD受容体に対する作動性を測定することができる。この場合、ヒトC R T H 2の活性化は宿主細胞の細胞内カルシウム濃度の上昇（例えばBoie, Y.ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995に記載された方法を例示できる）、走化性の亢進（例えばYokomizo, T.ら、Nature, 387: 620-624, 1997 に記載された方法を例示できる）、細胞表面のヒトC R T H 2分子のダウンモジュレーション（例えばLuttrell, L.M.ら、Science, 283: 655-661, 1999に記載された方法を例示できる）などを指標にすることができる。なお、ヒトC R T H 2の活性化を測定する場合に宿主として使用する哺乳類細胞株としては、K 5 6 2、J u r k a t、H E K 2 9 3、C H Oなどが例示できる。

## 【0040】

この手段において、被験物質により、*in situ* の状態のヒトC R T H 2のレセプター活性が増大すれば、被験物質は、ヒトプロスタグランジンD<sub>2</sub>受容体の活性を増強する、アゴニスト等として同定され、逆に、上記のレセプター活性が減少すれば、被験物質がヒトプロスタグランジンD<sub>2</sub>受容体の活性を減弱させる、アンタゴニスト等として同定される。

## 【0041】

ヒトC R T H 2、すなわち第2のヒトPGD<sub>2</sub>受容体に選択的なモジュレーターは、PGD<sub>2</sub>が関与する種々の疾患状態のうち、第2のヒトPGD<sub>2</sub>受容体が関与する疾患状態の治療および予防に有用である。第2のヒトPGD<sub>2</sub>受容体が関与する疾患状態はまだ十分特定されていないが、上記モジュレーターは、PGD<sub>2</sub>が関与する種々の疾患状態に対して、鎮静・睡眠薬、沈痛薬、血圧調節薬、血小板凝集抑制薬、循環器用薬、胃・腸の運動抑制薬、抗胃潰瘍薬、アレルギー

治療薬、抗炎症薬、緑内障の予防・治療薬などとしての幅広い有用性が期待される。

#### 【 0 0 4 2 】

このように、被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に、同物質のヒトC R T H 2 への作用（例えば、選択的なモジュレーター作用）を関連付けることにより、同物質のヒトプロスタグランジンD又はヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質を同定して、これを薬剤のスクリーニング等に用いて、産業上の多大な貢献をすることができる。

#### 【 0 0 4 3 】

##### 【実施例】

以下、実施例等により本発明を具体的に記載するが、この実施例により本発明の技術的範囲が限定して解釈されるべきものではない。

#### 【 0 0 4 4 】

##### 〔実施例1〕 ヒトC R T H 2 発現細胞の作成

ヒトC R T H 2 遺伝子発現プラスミド p R c / B 1 9 は Nagata, K. ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 および再公表特許 WO 9 7 / 4 6 6 7 7 に詳述された方法で作製した。なおヒトC R T H 2 c D N A 全長を組み込んだ形質転換体が、B 1 9 c D N A として、工業技術院生命工学研究所に寄託番号 F E R M P - 1 5 6 1 6 として寄託されているので、寄託者の了解を得て使用することもできる。その場合 B 1 9 c D N A を制限酵素 H i n d I I I および X b a I で消化し、プラスミド p R c / C M V (インビトロゲン社) の H i n d I I I / X b a I サイトにサブクローニングすれば上述の p R c / B 1 9 と同一の発現プラスミドが作製できる。この p R c / B 1 9 および対照のプラスミド p R c / C M V のそれぞれをヒト赤芽球系白血病細胞株である K 5 6 2 細胞にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、ゲネティシン (シグマ社) 4 0 0  $\mu$ g / ml 存在下で 2 - 3 週間選択培養した。p R c / B 1 9 を遺伝子導入した K 5 6 2 細胞については、生き残った細胞をウエル当たり 0. 3 細胞で 9 6 穴マイクロプレートに蒔き 2 - 3 週間培養した。増殖してきた細胞クローンを抗ヒトC R T H 2 抗体 (Nagata, K. ら、J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999) で蛍光染色し、ヒトC R T H 2 発



現の高いクローンKB8を得た。一方、対照のpRc/CMVを遺伝子導入したK562細胞はゲネティシンによる選択後、ポリクローンの状態で培養を維持した（以下、K562/neoと称する）。

#### 【0045】

##### 〔実施例2〕 比較対照のDプレセプター発現細胞の作成

ヒトDプレセプターcDNAはBoie, Y.ら、J. Biol. Chem., 270: 18910-18916, 1995および特表平10-507930に記載のヒトDプレセプターcDNAのDNA塩基配列を基にRT-PCR法でクローニングした。すなわち、ヒトDプレセプターの発現が高いことが知られているヒト小腸のpoly(A)+RNA（クローンテック社）を鋳型として、オリゴ(dT)プライマー（ファルマシア社）及びMMLV逆転写酵素（ファルマシア社）を用いてcDNAを調製した。次に、制限酵素HindIIIサイトを含むフォワードプライマー（5'-CTTCCGAAGCTTTCACCTCCAGCCCTCTGCTCCCG: 配列番号1）およびXbaIサイトを含むリバースプライマー（5'-GTTCTTTTCTATAAAATGTGACATATTCCTCAGCTTACC: 配列番号2）を用いてヒトDプレセプターの翻訳領域をPCR（94℃、1分；68℃、1分；72℃、1分の熱サイクルで35サイクル）で増幅した。得られたPCR産物をHindIIIおよびXbaIで消化し、pRc/CMVのHindIII/XbaIサイトにクローニングした。このようにして作製したヒトDプレセプターの発現プラスミドを実施例1で述べたと同様の方法でK562細胞に遺伝子導入し、ゲネティシンによる選択およびクローニング操作を行った。増殖してきた各クローンについて、後述する $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ 結合アッセイによりDプレセプター発現の高いクローンKD36を得た。

#### 【0046】

##### 〔実施例3〕 $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ 結合アッセイ

KB8、KD36およびK562/neoそれぞれの細胞を集め、 $3 \times 10^7$ 細胞/■lになるようにHank's balanced salt solution（HBSS、ギブコビーアールエル社）中に再懸濁させ、その0.1■lを0.5■lマイクロチューブに分注し、氷上で冷やした。次にHBSSで希釈した1nMの $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ （ア

マシヤム社)を加え、氷上で1時間反応させた。反応後の細胞を、1.5mlのマ  
 イクロチューブに入れ予め氷冷しておいた1M蔗糖および10%牛胎児血清を添  
 加したRPMI 1640培地(1ml)の上に穏やかに重層し、マイクロ遠心機で  
 10000回転、3分遠心した。0.1mlほど残して上清を吸引した後、再度、  
 10000回転で1分程遠心し、チューブ壁の反応液を全て落とし、細胞を吸わ  
 ないように注意して上清をできるだけ取り除いた。細胞に結合した放射活性を液  
 体シンチレーションカウンターで測定した。200倍濃度以上の非標識PGD<sub>2</sub>  
 存在下に同様に測定した時の放射活性を非特異的結合とした。その結果、第1図  
 に示すように、K562/neoには特異的な[<sup>3</sup>H]PGD<sub>2</sub>の結合は認めら  
 れなかった。一方、KB8、KD36ではいずれも[<sup>3</sup>H]PGD<sub>2</sub>の特異的な  
 結合が認められた。またこの測定系において、抗CPTH2抗体BM7 (Nagata  
 , K.ら, J. Immunol., 162: 1278-1286, 1999 およびNagata, K., ら)は濃度依  
 存的に、KB8に対する[<sup>3</sup>H]PGD<sub>2</sub>の結合だけを選択的に阻害した。この  
 方法でDPレセプターに作用しないヒトCPTH2選択的なモジュレーターを同  
 定できることが示された。

#### 【0047】

##### 〔実施例4〕 細胞内カルシウムアッセイ

KB8、KD36およびK562/neoそれぞれの細胞を集め、10%牛胎  
 児血清添加RPMI 1640培地中に $5 \times 10^6$ 細胞/mlになるように懸濁させ  
 、5  $\mu$ M Fura-2 AM (ドージンドー社)存在下で37℃、1時間培養し  
 た。培養後、細胞をHBSSで3回遠心洗浄しフリーのFura-2 AMを除い  
 た。次に、細胞を0.1%牛血清アルブミンを含むHBSS中に $10^6$ 細胞/ml  
 になるように再懸濁し、内容量0.4mlの石英セルに入れ、パーキンエルマー分  
 光光度計LS50Bにセットした。サンプル添加後の、励起波長340nmおよび  
 380nmにおける蛍光強度(510nm)の比の経時的な変化をFL-Winla  
 bソフトウェア(パーキンエルマー)で計算して求めた。K562/neoは0  
 .25-250nMのPGD<sub>2</sub>に対して有意な細胞内カルシウム濃度の変動は示さ  
 なかった。一方、KB8およびKD36ではいずれも数nMのPGD<sub>2</sub>処理により  
 顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇が誘導された。この測定系においても抗CR

TH2抗体BM7はヒトCRTH2選択的なアンタゴニスト活性を示した(第2図)。この方法でもDプレセプターに作用しないヒトCRTH2選択的なモジュレーターを同定できることが示された。

#### 【0048】

〔実施例5〕 ヒトCRTH2に対する種々のプロスタノイドの結合活性

実施例3で示した $[^3\text{H}] \text{PGD}_2$ 結合アッセイを種々の非標識プロスタノイド(いずれもケイマン社)存在下に実施し、ヒトCRTH2の各種プロスタノイドに対する結合親和性を評価した。その結果、ヒトCRTH2に対する結合親和性の強さの順位は $\text{PGD}_2 \geq 13, 14\text{-デヒドロ-}15\text{-ケトPGD}_2 \gg \text{プロスタグランジンJ}_2 (\text{PGJ}_2) > 15\text{-デオキシデルタ}12, 14\text{-PGJ}_2 \geq \text{プロスタグランジンE}_2 (\text{PGE}_2) = \text{プロスタグランジンA}_2 (\text{PGA}_2) \gg \text{トロンボキサンB}_2 (\text{TXB}_2)$ であった(第3図)。比較対照にしたDプレセプターに対する結合親和性の強さの順位は $\text{PGD}_2 = \text{PGJ}_2 \gg \text{PGE}_2 > 13, 14\text{-デヒドロ-}15\text{-ケトPGD}_2 > 15\text{-デオキシデルタ}12, 14\text{-PGJ}_2 \geq \text{TXB}_2 \geq \text{PGA}_2$ であった。ヒトCRTH2とDプレセプターの $\text{PGD}_2$ に対する結合親和性の強さは同等であったが、他のプロスタノイドに対する結合親和性では $13, 14\text{-デヒドロ-}15\text{-ケトPGD}_2$ のように大きな違いがあることが明らかになった。

#### 【0049】

〔実施例6〕 選択的アゴニストによるヒトCRTH分子のダウンモジュレーション

KB8細胞を、10%牛胎児血清添加RPMI1640培地に、 $10^6$ 細胞/■Lとなるように懸濁させ、種々の被験サンプル存在下において、37℃で1時間培養した。培養後、細胞をHBSSで2回遠心洗浄し、フリーのサンプルを除いた。次に、細胞を、0.5%牛血清アルブミンおよび0.05%NaN<sub>3</sub>を添加したHBSSに再懸濁し、抗CRTH2モノクローナル抗体BM16およびフィコエリスリン標識抗ラットイムノグロブリン抗体を用いて蛍光染色した。蛍光染色した細胞の平均蛍光強度をフローサイトメーター(ベクトンディッキンソン製)で測定し、サンプルを処理した細胞の値を、無処理(コントロール)の細胞の

値と比較した。その結果を、第4図に示す。

【0050】

第4図に示すように、選択的アゴニストであるPGD<sub>2</sub> および13, 14-デヒドロ-15-ケートPGD<sub>2</sub> では、コントロールに比べて有意にCRTH2のダウンモジュレーションを誘導したが、アゴニスト活性のないPGE<sub>2</sub> では、そのような効果は観察されなかった。すなわち、この方法により、CRTH2選択的なアゴニストを同定できることが示された。

【0051】

【発明の効果】

本発明により、Dプレセプター以外の、第2のヒトPGD<sub>2</sub> 受容体サブタイプを見出され、種々の疾患の治療や予防に有用な、この第2のPGD<sub>2</sub> 受容体サブタイプに対して作用する物質、例えば、選択的なモジュレーター（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）の同定法が提供される。

【0052】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BML, INC.

<120> Method of identifying property of substance against  
human prostaglandin D receptor

<130> PBM42

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Hominidae

<400> 1

cttccgaagc ttacactcca gccctctgct cccg

34

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hominidae

&lt;400&gt; 2

gttcttttct ataaaatgtg acatattcct cagcttacc

39

## 【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトCRTH2 (KB8) およびDPLレセプター (KD36) 発現細胞の [ $^3\text{H}$ ] PGD<sub>2</sub> 結合能を実施例3の方法で行った結果を示す図面である。

【図2】ヒトCRTH2 (KB8) およびDPLレセプター (KD36) 発現細胞のPGD<sub>2</sub> に対する反応を実施例4に示した細胞内カルシウムアッセイで測定した結果を示す図面である。

【図3】ヒトCRTH2およびDPLレセプターのリガンド選択性を実施例5に示した方法で測定した結果を示す図面である。

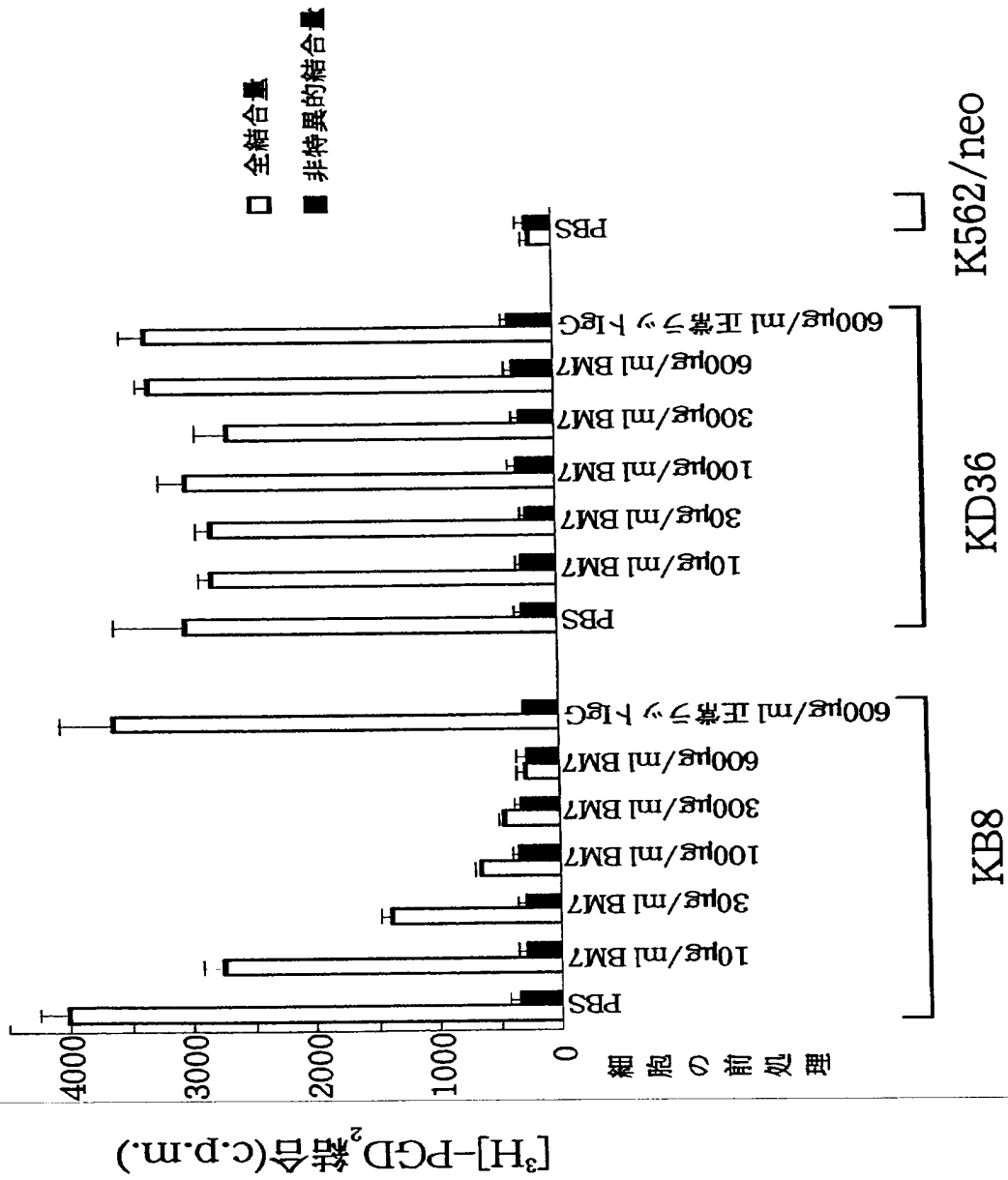
【図4】ヒトCRTH2の選択的アゴニストによる、細胞表面からのダウンモジュレーションを実施例6に示した方法で測定した結果を示す図面である。

【書類名】

図面

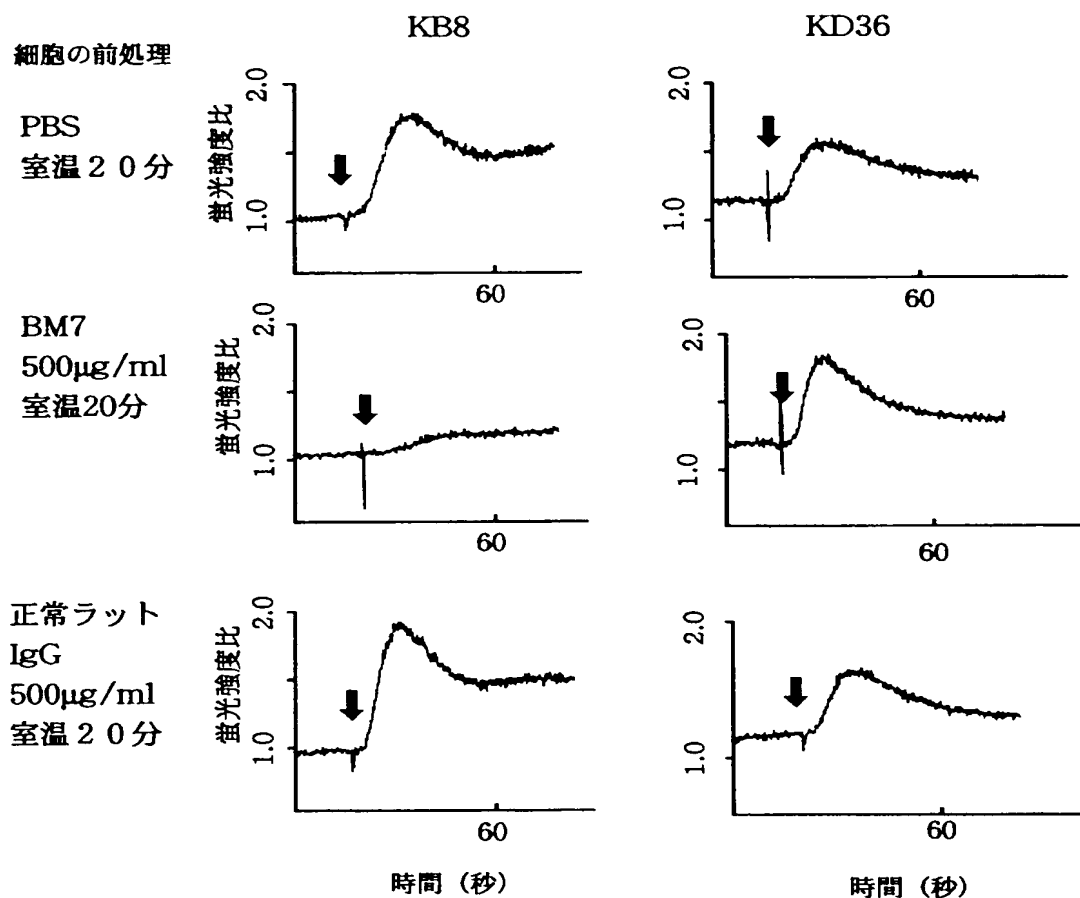
【図 1】

第 1 図



【図2】

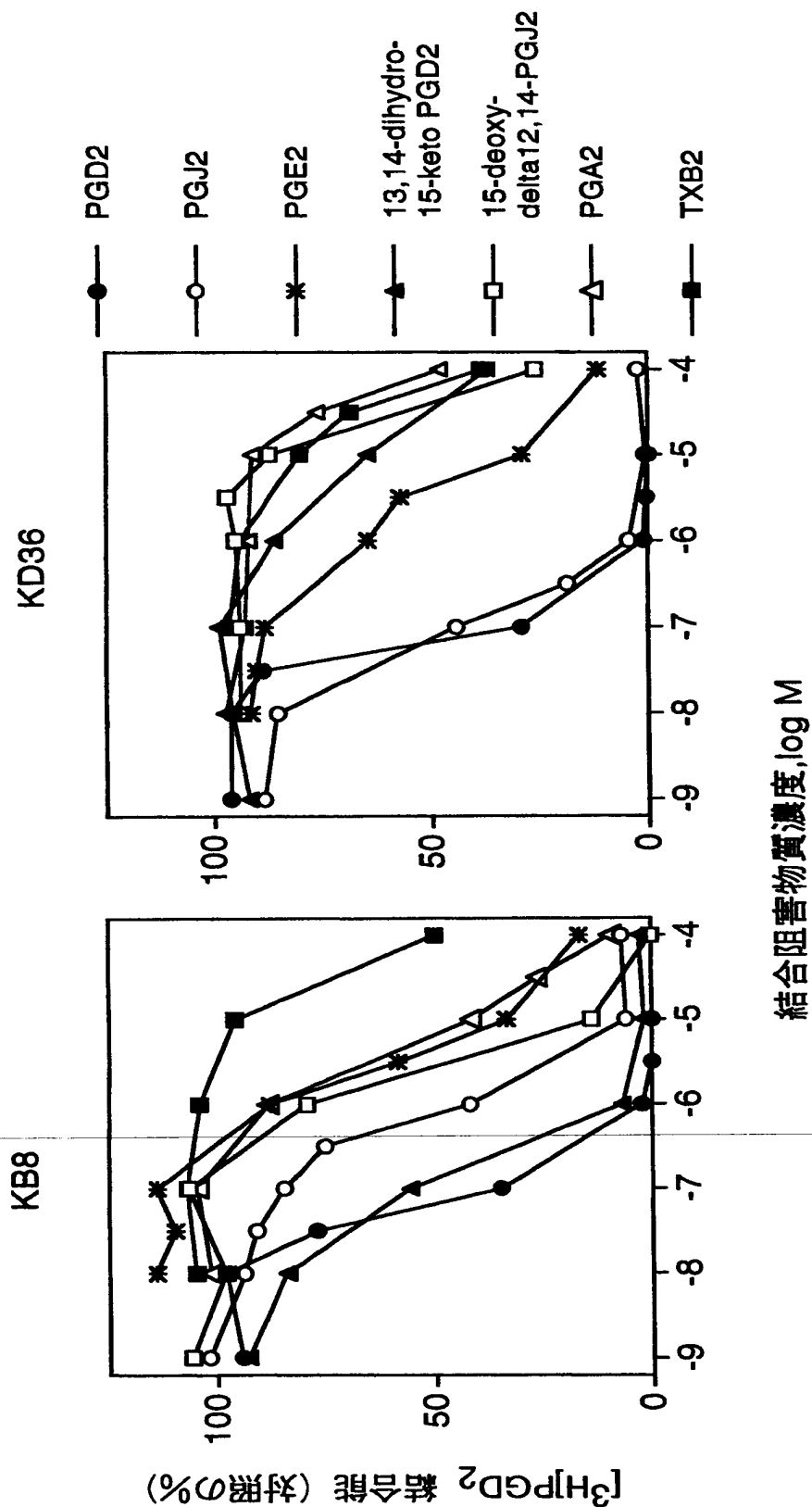
第 2 図



\* ↓ で終濃度25nM PGD<sub>2</sub>を反応液中に加えた。

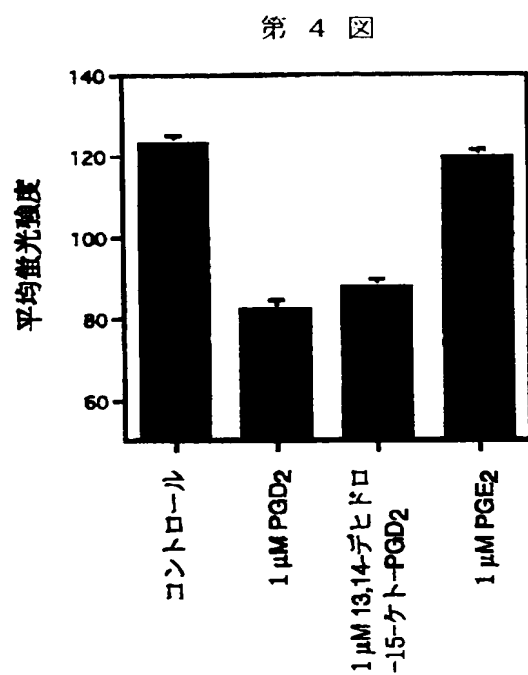
【図 3】

第 3 図





【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 D P レセプター以外の、第2のヒトプロスタグランジンD2受容体サブタイプを見出し、種々の疾患の治療や予防に有用な、この受容体サブタイプに対して作用する物質の同定法を提供すること。

【解決手段】 被験物質のヒトプロスタグランジンD受容体への作用に、同物質のヒトC R T H 2への作用を関連付けることにより、同物質のヒトプロスタグランジンD受容体に対する性質を同定する同定方法を提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591083336]

1. 変更年月日

1993年 8月26日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号

氏 名

株式会社ビー・エム・エル

